

PCT

世界知的所有権機関  
国際事務局  
特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類6 G01N 30/88, 30/48	A1	(II) 国際公開番号 WO98/33064																																																																																								
		(43) 国際公開日 1998年7月30日(30.07.98)																																																																																								
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP98/00296</p> <p>(22) 国際出願日 1998年1月26日(26.01.98)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平9/11601 1997年1月24日(24.01.97) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) ファルマシア バイオテク株式会社 (PHARMACIA BIOTECH K.K.)(JP/JP) 〒141 東京都品川区上大崎4丁目5番37号 本多電機ビル Tokyo, (JP)</p> <p>(72) 発明者; および</p> <p>(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 岡野光夫(OKANO, Teruo)(JP/JP) 〒272 千葉県市川市国府台6-12-12 Chiba, (JP)</p> <p>菊池明彦(KIKUCHI, Akihiko)(JP/JP) 〒169 東京都新宿区百人町3-26-1-401 Tokyo, (JP)</p> <p>桜井靖久(SAKURAI, Yasuhisa)(JP/JP) 〒168 東京都杉並区永福3-17-6 Tokyo, (JP)</p> <p>金澤秀子(KANAZAWA, Hideko)(JP/JP) 〒228 神奈川県相模原市上鶴間3451-1-201 Kanagawa, (JP)</p> <p>(81) 指定国 JP, US, 歐州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>																																																																																										
<p>(54) Title: METHOD FOR SEPARATING PTH AMINO ACIDS</p> <p>(54) 発明の名称 PTH-アミノ酸の分離方法</p> <p>(57) Abstract PTH amino acids are separated by chromatography using as a stationary phase a filler whose surface can be changed in hydrophilic/hydrophobic balance by means of an external signal such as a temperature change while keeping a mobile phase fixed to an aqueous system. Thus, PTH amino acids can be analyzed with a high sensitivity in a short time.</p> <p>RELATIONSHIP BETWEEN TEMPERATURE AND RETENTION TIME OF PTH AMINO ACIDS PTH-アミノ酸の温度と保持時間の関係 1</p> <table border="1"> <caption>Estimated data from the graph</caption> <thead> <tr> <th>Temperature (°C)</th> <th>Arg (min)</th> <th>Asp (min)</th> <th>Cys (min)</th> <th>Glu (min)</th> <th>His (min)</th> <th>Lys (min)</th> <th>Phe (min)</th> <th>Thr (min)</th> <th>Trp (min)</th> <th>Tyr (min)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>10</td> </tr> <tr> <td>20</td> <td>15</td> </tr> <tr> <td>30</td> <td>20</td> </tr> <tr> <td>40</td> <td>25</td> </tr> <tr> <td>50</td> <td>30</td> </tr> <tr> <td>60</td> <td>35</td> </tr> </tbody> </table>			Temperature (°C)	Arg (min)	Asp (min)	Cys (min)	Glu (min)	His (min)	Lys (min)	Phe (min)	Thr (min)	Trp (min)	Tyr (min)	0	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	20	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	30	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	40	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	50	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	60	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35
Temperature (°C)	Arg (min)	Asp (min)	Cys (min)	Glu (min)	His (min)	Lys (min)	Phe (min)	Thr (min)	Trp (min)	Tyr (min)																																																																																
0	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5																																																																																
10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10																																																																																
20	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15																																																																																
30	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20																																																																																
40	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25																																																																																
50	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30																																																																																
60	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35																																																																																

## (57) 要約

移動相を水系に固定したままで、固定相表面の親水性／疎水性のバランスを温度変化のような外的信号によって変化させることができるので充填剤を用いて PTH-アミノ酸のクロマトグラフィーによる分離を行うことによって、PTH-アミノ酸を短時間でかつ高感度に分析することができる。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード（参考情報）

A L	アルバニア	F I	フィンランド	L T	リトアニア	S N	セネガル
A M	アルメニア	F R	フランス	L U	ルクセンブルグ	S Z	スウェーデン
A T	オーストリア	G A	ガボン	L V	ルクセンブルグ	T D	チャーハン
A U	オーストラリア	G B	英國	M C	モナコ	T G	トーゴ
A Z	オーストリア・ハンガリー	G E	グルジア	M D	モルドバ	T J	タジキスタン
B A	ボスニア・ヘルツェゴビナ	G H	ガーナ	M G	マダガスカル	T M	トルコメニスタン
B B	バルバドス	G M	ガンビア	M K	マケドニア共和国	T R	トルコ
B E F	ベルギー	G N	ギニア	M L	マラウイ	T T	トリニダード・トバゴ
B E F G	ブルガリア・ファン	G W	ギニアビサウ	M N	ギンバール	U A	ウクライナ
B E G	ブルガリア	G R	ギリシャ	M R	ギニアビサウ	U G	ウガンダ
B E R Y	ベナン	H U	ハンガリー	M W	マラウイ	U S	米国
B R J	ブラジル	I D E	イングランド	M X	マキシコ	U Z	ウズベキスタン
B R Y	ペラルーシ	I L S	アイスラエル	M N E	ミンニエール	V N	ヴィエトナム
C C A	カナダ	I P	イタリア	M N L	オランダ	Y U	ヨーロッパ
C C E F	中央アフリカ共和国	I P E	日本	N O	ノルウェー	Z W	ジンバブエ
C C G H	コートジボアール	K E	ケニア	N O Z	ノーランド		
C C I	コートジボアール	K E G	キルギス	P P L	ニーランド		
C C M	カメルーン	K K P	北朝鮮	P P T	ボルトガル		
C C N	中国	K K R	中国	R O	ボーラニア		
C C L	キューバ	K Z C	カザフスタン	R O U	ロシア		
C C Y	キプロス	L I C	セント・ルシア	S S D	シングラ		
C C Z	キプロス	L I K	リヒテンシュタイン	S S E G	スウェーデン		
D E E	ドイツ	L L R	リベリア	S S S G	スウェーデン		
D K E	デンマーク	L S	レソト	S S S K	シロガニニア		
E E S	エストニア			S S L	スロバキア		
	スペイン				シエラ・レオネ		

明細書  
P T H-アミノ酸の分離方法

技術分野

本発明は、水系で固定相表面の親水性／疎水性のバランスを外的信号（例えば、  
5 温度）によって変化させて P T H-アミノ酸（アミノ酸の 3-フェニル-2-チ  
オヒダントイン誘導体）をクロマトグラフィーにより分離する P T H-アミノ酸  
の新規な分離方法に関する。

背景技術

10 蛋白質やペプチドなどのアミノ酸配列の決定は Edman 分解法により、アミ  
ノ酸末端から逐次アミノ酸残基をアニリノチアゾリノンとして遊離させ、酸性下  
で、安定なフェニルチオヒダントイン誘導体（P T H-アミノ酸）に変換して同  
定される。同定には逆相カラムを用いた液体クロマトグラフィーが一般的に用い  
られている。蛋白質を構成する 20 種のアミノ酸はこの逆相カラムにより、一回  
15 の分析によりすべて分離され、比較的高感度に、1 時間以内に分析が可能である。

種々の逆相系のカラムが市販されているが、固定相に多孔性のシリカゲルが用  
いられており、これにオクタデシルシラン基やフェニル基が化学結合により固定  
化され、シリカ担体表面が疎水性になっている。この逆相表面での各 P T H-ア  
ミノ酸の疎水性度の違いにより分離される。クロマトグラフィー溶離液には緩衝  
20 液と水と自由に混合可能な有機溶媒の混合液が用いられている。

P T H-アミノ酸の溶出には移動相中の有機溶媒の濃度を連続的に増加させて  
溶出する方法と一定濃度で分離する方法がある。いずれにしても、溶出溶媒の疎  
水性や親水性を変化させて溶出させる。緩衝液としては、酢酸ナトリウム系や酢  
酸アンモニウム系が主に用いられている。有機溶媒としては、アセトニトリルや  
25 メタノールが主に用いられている。様々な分離条件、例えば、溶出液の流速、イ  
オン強度、p H やカラム温度などにより分離能が大きく変化する。市販のカラム  
の種類により異なるが、一般的に高温での分離によって良好な結果が得られる。  
分離した P T H-アミノ酸は UV 検出器により、254 nm や 268 nm などの

WO 98/33064

PCT/JP98/00296

波長で検出し、標準の PTH-アミノ酸の溶出時間と比較し同定される。

しかし、従来の移動相に用いられている有機溶媒や緩衝液は溶出液に夾雑物として含まれ、それらの UV 吸収が非常に強くなるために、ベースラインの安定化や感度が著しく低下する欠点があった。また、連続して分析を行う前にカラムを 5 洗浄し、初期の溶出液で平衡化する必要があるため、分析時間が長くなるという欠点もあった。しかも、このような有機溶媒や緩衝液は環境汚染を引き起こす虞れがある。したがって、これらの物質を用いない分離方法の確立が必要となってきた。

かかる問題点を解決するために、水系で生体要素（蛋白質、DNA、糖、脂質等）および細胞を固体表面との相互作用を外的信号（例えば、温度）によって制御し、分離あるいは精製することができるクロマトグラフィー用充填剤を使用したクロマトグラフィー方法が提案されている（特開平7-318551号公報参照）。この方法によれば、移動相に有機溶媒や緩衝液を使用することなく、移動相を水系に固定したままで温度変化による固定相の表面特性の制御によって生体要素や細胞の分離精製が可能となる。このため、单一の水系の移動相によって蛋白質や細胞などの生体要素の機能を維持したままで分離・回収が可能となり夾雑物の混入を防止できる。

しかしながら、特開平7-318551号公報に記載された方法で分離・精製が可能な溶質は生理活性を有する蛋白質や細胞などで、具体的には牛血清アルブミン、IgG、フィブリノーゲン、フィブロネクチン、トランスフェリン、血液凝固因子等が開示されている（例えば、同公報第5頁第7欄第5行～第10行）のみであり、その他の物質については全く教示されていない。

### 発明の開示

25 本発明者らは、PTH-アミノ酸の短時間かつ高感度分析を開発すべく鋭意研究を重ねた結果、特開平7-318551号公報に記載された方法では遊離アミノ酸を分析することは不可能であるにも拘わらず、PTH-アミノ酸を分析することが可能であるという当業者にとっても予期しない事実を発見し、この知見に基づいて本発明を完成した。

WO 98/33064

PCT/JP98/00296

本発明は、移動相を水系に固定したままで、固定相表面の親水性／疎水性のバランスを外的信号によって変化させることが可能である充填剤を用いて PTH-アミノ酸のクロマトグラフィーによる分離を行うことを特徴とする PTH-アミノ酸の分離方法を提供する。

5 また本発明は、アミノ基、カルボキシル基、或いは水酸基等を有するポリアルキルアクリルアミド或いはその共重合体で化学修飾したクロマトグラフィー用充填剤よりなる固定相に PTH-アミノ酸を保持させた後、外部温度を段階的に変化させ、同一の移動相を通過させることによって PTH-アミノ酸を分離する  
10 ことを特徴とする PTH-アミノ酸の分離方法を提供する。

#### 図面の簡単な説明

図1は、実施例1に記載された分離方法により得られた17種類のPTH-アミノ酸の分析結果を示すチャートである。

15 図2は、実施例3に記載された分離方法により得られた14種類のPTH-アミノ酸の分析結果を示すチャートである。

図3は、実施例4において使用した20種類のPTH-アミノ酸のうち10種類のPTH-アミノ酸の温度と保持時間の関係を示すグラフである。

20 図4は、図3に記載されていない残りの10種類のPTH-アミノ酸の温度と保持時間の関係を示すグラフである。

図5は、実施例5に記載された分離方法により得られた6種類のPTH-アミノ酸の分析結果を示すチャートである。

#### 発明を実施するための最良の形態

25 本発明の方法によって分離する PTH-アミノ酸の種類は何ら限定されることなく、PTH-アミノ酸であればいかなる PTH-アミノ酸であってもよい。

本発明の方法において水系とは、水のみ、あるいは無機塩類を含む水溶液であって、有機溶媒を含まないものを意味する。また、この場合、水とは蒸留水もしくは脱イオン水、あるいは両者を表わす。

WO 98/33064

PCT/JP98/00296

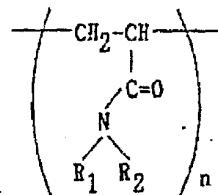
本発明の方法において用いる外的信号とは、例えば、温度変化である。温度変化によって固定相表面の親水性／疎水性のバランスを変化させることは、例えば、クロマトグラフィー用充填剤の担体表面に温度応答性高分子を導入することによって達成される。このような充填剤として、例えば、担体表面を末端にアミノ基、

5 カルボキシル基、或いは水酸基等を有するポリアルキルアクリルアミド或いはその共重合体で化学修飾したクロマトグラフィー用充填剤を挙げられる。この化学修飾した充填剤の例としては、表面にアミノ基、カルボキシル基、或いは水酸基等の官能基を有するシリカ担体に前記のポリアルキルアクリルアミド或いはその共重合体を化学修飾したもの挙げることができる。アミノ基、カルボキシル基、  
10 或いは水酸基等の官能基を有するシリカ担体の具体例としては、アミノプロピルシリカゲル、アミノセファデックス、イオン交換樹脂等がある。

本発明の方法において使用するポリアルキルアクリルアミドとしては、下記の式に示すポリ-(N-イソプロピルアクリルアミド)、ポリジエチルアクリルアミドおよびポリアクリロイルピロリジンのいずれか一種、或いはこれらのポリマー

15 の構成単位とアルキルアクリレート若しくはアルキルメタクリレートとの共重合体が好ましい。

### ポリーアルキルアクリルアミド

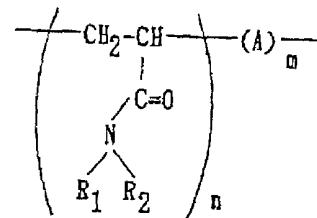


	$\text{R}_1$	$\text{R}_2$	略号
ポリ(N-イソプロピルアクリルアミド)	$-\text{H}$	$-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$	ポリ(IPAAm)
ポリ(N,N'-ジエチルアクリルアミド)	$-\text{C}_2\text{H}_5$	$-\text{C}_2\text{H}_5$	ポリ(DEAAm)
ポリ(アクリロイルピロリジン)			ポリ(APy)

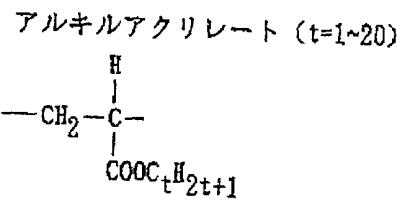
WO 98/33064

PCT/JP98/00296

## 共重合体

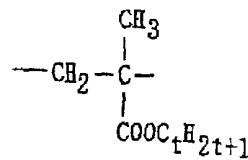


A : 50~60%含有



A

アルキルメタクリレート (t=1~20)



ポリ-(N-イソプロピルアクリルアミド) (PIPAAm) は32°Cに下限臨界温度を有するので、該分子で化学修飾した担体はこの臨界温度で親水／疎水に表面物性が変化するため、これをクロマトグラフィーの充填剤の表面にグラフトもしくはコーティングして使用した場合、試料に対する保持力が温度によって変化するため溶出液の組成を変化させずに保持挙動を温度によってコントロールすることが可能である。下限臨界温度を32°C以上にするためには、イソプロピルアクリルアミドよりも親水性のモノマーであるアクリルアミド、メタアクリル酸、アクリル酸、ジメチルアクリルアミド、ビニルピロリドンなどをN-イソプロピルアクリルアミドと共に重合させることによって調整することが可能である。また、下限臨界温度を32°C以下にしたいときは、疎水性モノマーであるスチレン、アルキルメタクリレート、アルキルアクリレートなどとの共重合によって調整することができる。

また、ポリジエチルアクリルアミドの下限臨界温度は、約30°C～32°Cであり、この温度を境として親水／疎水に表面物性が変化し、前述のポリ-(N-イソプロピルアクリルアミド)の場合と同様に、試料に対する保持力を温度によって調整することができる。本発明で利用される新規なクロマトグラフィー用担体は、化学修飾或いは高分子のコーティングによって作製される。化学修飾手段としては表面グラフト法とラジカル重合の2つの方法を用いることができる。またコーティング方法としては、適用温度範囲内で不溶とした後、不溶なものをコーティングする。

上記したように、温度応答性高分子を担体へ導入するための化学修飾法は表面グラフト法とラジカル重合法を用いることができる。表面グラフト法は一定の大きさの温度応答性高分子を始めに合成して、担体に接合する方法であるのに対して、ラジカル重合法では担体表面上でモノマーから重合させ高分子を構築する方法である。表面グラフト法に比較し、担体表面に密に温度応答性高分子を導入することができる。担体表面の疎水性度を増大させ、保持時間をコントロールしやすくなる。また、担体表面でのシリカゲルとの相互作用による非特異的吸着を抑えることができる。

WO 98/33064

PCT/JP98/00296

実施例

以下に実施例を挙げて本発明を更に詳しく説明するが、本発明はこれによって何ら限定されるものではない。

## [実施例 1]

5

ポリマーの合成

カルボキシル末端基を持つIPAAmコポリマーを分子量4000を目標として合成した。ここでコポリマーの分子量は、連鎖移動剤である3-メルカブトブロピオン酸(MPA)の量によって設定することができる。文献値より分子量4000のコポリマーを合成するには、モル比で、MPA/(IPAAm+RMA)=0.028となるようにMPAの量を調製した。

精製モノマー(IPAAm:25.0g)

疎水性モノマー(IPAAmに対しモル比で1%BMA:0.313g、3%BMA:0.972g、5%BMA:1.653g、1%HMA:0.38g)

15

ラジカル開始剤(AIBN:0.145g)

連鎖移動剤(MPA, 1%BMA:0.662g、3%BMA:0.677g、5%BMA:0.691g、1%HMA:0.663g)

DMF(50ml)

## (注)用語の説明

20

IPAAm:N-イソプロピルアクリルアミド

BMA:n-ブチルメタクリレート

AIBN:2,2'-アゾビス(イソブチロニトリル)

HMA:n-ヘキシルメタクリレート

MPA:3-メルカブトブロピオン酸

25

DMF:N,N-ジメチルホルムアミド

上記の各材料を重合管に入れ、三方活栓を取り付け輪ゴムで固定した。そして、コックを閉じた状態で重合管を液体窒素に入れ完全に凍結させ、次にコックを開いて真空ポンプを用いて脱気した。次に再びコックを閉じてメタノール中に入れ管内のサンプルを完全に溶解させた。この操作を3回繰り返した(凍結融解脱

気法）。このように、充分脱気したサンプル（减压状态になっている重合管）を 70 °Cの振とう恒温槽に入れ、2時間ラジカル重合反応させ片末端にカルボキシル基を持つコポリマーを合成した。反応后、室温になるまで放置し、溶媒（DMF）を40 °Cで减压蒸留し濃縮し、残留物を氷冷したジエチルエーテルに滴下し 5 ポリマーを得た。得たポリマーを滤取し、常温で一晩减压乾燥し、その乾燥物をアセトンに溶かし再びジエチルエーテルで精製し、これによって得たポリマーを再び滤取しこれを常温で一晩减压乾燥した。この后、得たポリマーを5%の溶液 10 になるように溶かした。これを透析膜を用いて3日間透析を行った（こまめに水を取り替えた）。透析后、透析を終えた溶液を適當な容器に移し冻结乾燥器を用いて2日間冻结乾燥を行った。これによって、さらに純度の高いコポリマーを得た。

#### I P A A m c o p o l y m e r の担体への導入

##### <活性エステル（スクシニル）化法>

15	上記の合成コポリマー	1モル当量
	D C C	2. 5モル当量
	N-ヒドロキシスクシンイミド	2. 5モル当量
	酢酸エチル	100ml

1. ナス型コルベンに合成コポリマーを入れ、半量の酢酸エチルで溶かした。  
 20 2. N-ヒドロキシスクシンイミド（N-Hydroxysuccinimid e）を加え、さらにサンプル瓶にD C C（ジシクロヘキシルカルボジイミド）を量り取り、残りの酢酸エチルで溶かして加えた。  
 3. 4°Cの氷水に浸し2時間スターで攪拌し、後に25°Cに設定した恒温槽に入れて一晩攪拌した。  
 25 4. 溶液を滤過し、副生成物であるジシクロヘキシル尿素を取り除き、减压下で濃縮した。  
 5. 最後にジエチルエーテルで精製し、生成物を滤取・减压乾燥して得られたスクシニル化コポリマーを冷凍庫に保存した。

担体(シリカゲル)への結合

スクシニル化したコポリマーを、溶媒に1, 4-ジオキサンを用いて、3回に分けてアミノプロピルシリカゲルと反応させた。反応温度は室温(25°C)で行った。

- 5 1. スクシニル化ポリマー(1.5 g)を1, 4-ジオキサン(50 ml)に溶かし、振とう恒温槽中でアミノプロピルシリカゲル(3 g)と一晩反応させた。
2. 反応液を濾取したものと、新たなコポリマー(1.5 g)を再び1, 4-ジオキサン(50 ml)に溶かし一晩反応させた。この操作を2回繰り返した。
3. 最後に濾取したものを、メタノール(500 ml)、蒸留水(1 l)、超純水(500 ml)で十分洗浄し、これを充填剤として減圧乾燥してデシケーターに保存した。

試料の調製

[試料A] 17種類のPTH-アミノ酸を蒸留水に溶解し、次の濃度を有する  
15 PTH-アミノ酸混合液10 mlを調製した。

1. PTH-L-アルギニン塩酸塩	1. 000 mg/ml
2. PTH-L-アスパラギン	0. 404 mg/ml
3. PTH-L-アスパラギン酸	1. 084 mg/ml
4. PTH-L-システイン酸カリウム	1. 000 mg/ml
20 5. PTH-L-シトルリン	0. 001 mg/ml
6. PTH-L-グルタミン	0. 124 mg/ml
7. PTH-L-グルタミン酸	0. 471 mg/ml
8. PTH-グリシン	0. 103 mg/ml
9. PTH-L-ヒスチジン塩酸塩	1. 000 mg/ml
25 10. PTH-L-ロイシン	0. 014 mg/ml
11. PTH-L-リシン	0. 005 mg/ml
12. PTH-DL-メチオニン	0. 063 mg/ml
13. PTH-L-フェニルアラニン	0. 038 mg/ml
14. PTH-L-プロリン	0. 038 mg/ml

WO 98/33064

PCT/JP98/00296

15.	PTH- $\Delta$ -トレオニン	0.019 mg/ml
16.	PTH-DL-トリプトファン	0.019 mg/ml
17.	PTH-L-チロシン	0.077 mg/ml

[試料B] 20種類のPTH-アミノ酸を蒸留水に溶解し、次の濃度を有する

5 PTH-アミノ酸混合液10mlを調製した。

1.	PTH-DL- $\alpha$ -アラニン	0.423 mg/ml
2.	PTH-L-アルギニン塩酸塩	1.000 mg/ml
3.	PTH-L-アスパラギン	0.404 mg/ml
4.	PTH-L-アスパラギン酸	1.084 mg/ml
10	5. PTH-L-システイン酸カリウム	1.000 mg/ml
6.	PTH-L-グルタミン	0.124 mg/ml
7.	PTH-L-グルタミン酸	0.471 mg/ml
8.	PTH-グリシン	0.103 mg/ml
9.	PTH-L-ヒスチジン塩酸塩	1.000 mg/ml
15	10. PTH-DL-イソロイシン	0.006 mg/ml
11.	PTH-L-ロイシン	0.014 mg/ml
12.	PTH-L-リシン	0.005 mg/ml
13.	PTH-DL-メチオニン	0.063 mg/ml
14.	PTH-L-フェニルアラニン	0.038 mg/ml
20	15. PTH-L-プロリン	0.038 mg/ml
16.	PTH-DL-セリン	0.553 mg/ml
17.	PTH- $\Delta$ -トレオニン	0.019 mg/ml
18.	PTH-DL-トリプトファン	0.019 mg/ml
19.	PTH-L-チロシン	0.077 mg/ml
25	20. PTH-DL-バリン	0.024 mg/ml

[試料C] 14種類のPTH-アミノ酸を蒸留水に溶解し、次の濃度を有する

PTH-アミノ酸混合液10mlを調製した。

1.	PTH-L-アスパラギン酸	1.084 mg/ml
2.	PTH-L-グルタミン酸	0.471 mg/ml

WO 98/33064

PCT/JP98/00296

3.	PTH-L-アスパラギン	0.404 mg/ml
4.	PTH-L-グルタミン	0.124 mg/ml
5.	PTH-L-ヒスチジン塩酸塩	1.000 mg/ml
6.	PTH-DL- $\alpha$ -アラニン	0.423 mg/ml
5	7. PTH-L-アルギニン塩酸塩	1.000 mg/ml
	8. PTH-L-プロリン	0.038 mg/ml
	9. PTH-DL-メチオニン	0.063 mg/ml
	10. PTH- $\Delta$ -トレオニン	0.019 mg/ml
	11. PTH-L-ロイシン	0.014 mg/ml
10	12. PTH-L-フェニルアラニン	0.038 mg/ml
	13. PTH-L-チロシン	0.077 mg/ml
	14. PTH-DL-トリプトファン	0.019 mg/ml

試料Aに含まれるPTH-アミノ酸の分離

15 上記充填剤(P I P A A m - B M A 5 %で化学修飾したシリカ)を充填したカラムに試料A 100  $\mu$ lを注入した。カラムは高速液体クロマトグラフィー(HPLC)に接続し、溶出液に蒸留水を用いて、流速1.0 ml/分の速度で分離を行い、紫外可視吸光度検出器により254 nmの波長で検出を行った。カラムを恒温槽に設置し、カラム温度を変化させて分離能を比較した。ポリ-(N-イソプロピルアクリルアミド)は32°Cで疎水性/親水性の担体表面物性が変化するが、この変化する温度を前記したように下限臨界温度という。この温度以下の5°Cでは、最も遅い保持時間を示すPTH-L-リシン(図1のピーク11)の保持時間は22分であったが、30°Cでは61分となった(図1)。このようにカラムの温度を変化させることによって、担体表面の疎水性/親水性を変化させ、各PTH-アミノ酸の溶出時間を変化させることが可能であることを確認した。

## [実施例2]

試料Bに含まれるPTH-アミノ酸の分離

実施例1における試料Aに含まれるPTH-アミノ酸の分離の項に記載された分離条件と同様にして、試料Bに含まれる20種類のPTH-アミノ酸の分離を

行った。

[実施例3]

試料Cに含まれるPTH-アミノ酸の分離

5 特開平7-318551号公報の実施例1に記載されている(a)～(d)の方法に従ってポリ-(N-イソプロピルアクリルアミド)ゲルでグラフト化したシリカ(ポリ(IPAAm)ゲルグラフトシリカ)を作製した。これを充填剤として充填したカラムに試料C 50  $\mu$ lを注入した。カラムは高速液体クロマトグラフに接続し、溶出液に0.5M塩化ナトリウム水溶液を用いて、流速1.0m  
10 1/分の速度で分離を行い、紫外線可視吸光度検出器により254nmの波長で検出を行った。カラムを恒温槽に設置し、カラム温度を5°Cおよび40°Cに設定して分離能を比較した。結果を図2に示す。

15 図2から明らかなように、カラム温度が5°Cでは14種類のPTH-アミノ酸の分離が困難であったが、下限臨界温度以上の40°Cでは表面は疎水性となり、疎水面での相互作用が強くなり、それぞれの保持時間が遅くなり、分離が可能となっている。この様にカラム温度を制御することで担体表面の物性の制御が可能であり、最適な分離条件の決定が可能となる。また、下限臨界温度はN-イソブロピルアクリルアミドモノマーに対するN,N-ジメチルアクリルアミドモノマーの量を変化させ、重合させることで、任意の温度で相転移を示す温度応答性ポリマーを合成可能である。

20 なお、図2に示されているように、40°Cでは分析時間が65分になっているが、温度グラディエントをかけて分離することによって、より短時間に分離を行うことが可能となる。

25 [実施例4]

PTH-アミノ酸の温度と保持時間の関係の検討

実施例1の試料Aに含まれるPTH-アミノ酸の分離の項に記載された分離条件と同様にして、試料Bに含まれるアミノ酸の分離を行い、各PTH-アミノ酸の温度と保持時間の関係を調べた。カラム温度は5°C、10°C、15°C、20°C、

WO 98/33064

PCT/JP98/00296

25°C、30°C、35°C、40°C、45°Cおよび50°Cの10段階に変化させ、各々のカラム温度における各PTH-アミノ酸の保持時間を測定した。結果を図3および図4に示す。

図3および図4から、温度変化に伴って、PTH-リシンを除いて溶出時間が大きく変化する疎水性アミノ酸と変化が小さい極性アミノ酸に分類することができることが確認された。したがって、カラム温度を適切に設定することにより最適な分離条件の決定が容易になし得る。

[実施例5]

10 アミノプロピルシリカ表面へのラジカル重合法によるゲル層の形成

1) アミノプロピルシリカへの重合開始剤の導入

充填剤の担体であるアミノプロピルシリカ5gにDMF中で両端にカルボキシル基を有するアゾ系重合開始剤である4,4'-アゾビス(4-シアノペンタン酸) (4,4'-azobis(4-cyanopenanoic acid) : V-501) 3.5g (12.5mmol) を、N-エトキシカルボニル-2-エトキシ-1,2-ジヒドロキノリン (N-Ethoxycarbonyl-2-ethoxy-1,2-dihydroquinoline : EEDQ) 6.18g (25.0mmol) を縮合剤として用い、窒素雰囲気下、室温で6時間反応させた。これによりアミノプロピルシリカに重合開始剤V-501をアミド結合を介して導入固定化した。

2) 表面ゲル層の形成

1) で作製したV-501固定化シリカ4gに、IPAAm (イソプロピルアクリルアミド) 10g およびN,N'-メチレンービス(アクリルアミド) (N,N'-Methylene-bis(acrylamide)) 0.27g 共存下でエタノール中にて窒素雰囲気下、70°Cで5時間重合反応を行った。これにより担体表面にゲル層を形成した。得られた担体(ゲル(IPAAm-2%BS)シリカ)を以下で充填剤として使用した。

試料の調製

次の6種類のPTH-アミノ酸を含有するPTH-アミノ酸混合液10mlを調製した。

1.	PTH-L-グルタミン	0.124 mg/ml
5	2. PTH-L-グリシン	0.103 mg/ml
	3. PTH-DL- $\alpha$ -アラニン	0.423 mg/ml
	4. PTH-DL-メチオニン	0.063 mg/ml
	5. PTH-L-ロイシン	0.014 mg/ml
	6. PTH-L-チロシン	0.077 mg/ml

10

試料に含まれるPTH-アミノ酸の分離

上記充填剤(ゲル(IPAAm-2%BIS)シリカ)を充填したカラムに上記試料50 $\mu$ lを注入した。カラムは高速液体クロマトグラフに接続し、溶出液に蒸留水を用いて、流速1.0ml/分の速度で分離を行い、紫外可視吸光度検出器により254nmの波長で検出を行った。カラムを恒温槽に設置し、カラム15 温度を5°Cおよび50°Cに設定して分離能を比較した。結果を図5に示す。

図5から明らかなように、ラジカル重合法により化学修飾した担体を充填剤として用いることにより、PTH-アミノ酸の分離を簡単に行うことが可能で、温度により、保持時間をコントロールすることができる。表面グラフト法により合成した担体を用いた場合よりも、温度応答性高分子がより多く導入され、保持時間が延びており、溶出が早いアミノ酸の分離性能を向上させることができる。これは、次のような理由によるものと考えられる。

表面グラフト法は一定の大きさの温度応答性高分子を始めに合成して、担体に接合する方法であるのに対して、ラジカル重合法では担体表面上でモノマーから重合させ高分子を構築する方法である。表面グラフト法に比較し、担体表面に密に温度応答性高分子を導入することが可能である。したがって、担体表面の疎水性度を増大させ、保持時間をコントロールしやすくなる。また、担体表面でのシリカゲルとの相互作用による非特異的吸着を抑えることができる。

WO 98/33064

PCT/JP98/00296

産業上の利用の可能性

以上詳述したように、本発明の PTH-アミノ酸の分離方法は、下記の利点を有する。

5 (1) 移動相としてアセトニトリル、メタノール等の有機溶媒を用いる必要がなく、水系のみで分離可能である。

(2) 移動相の調製が容易である。

(3) 有機溶媒や酢酸緩衝液などを用いないため、不純物の混入が少なく、安定したベースラインの検出が可能であり、高感度検出が可能である。

10 (4) 有機溶媒を用いないために、脱気操作による有機溶媒の混合組成の変化がない。

(5) 再現性の高い分離が得られる。

例えば、下記の表に示すような再現性が得られた。

表1

試料	保持時間(min)	C. V.
PTH-メチオニン(Met)	9.686	0.057
PTH-ロイシン (Leu)	16.894	0.067
PTH-トリプトファン(Trp)	37.814	0.058
PTH-リシン(Lys)	57.608	0.053

(測定温度：50°C)

(注) ① 再現性に関する実験方法について

上記充填剤（ゲル（IPA Am）シリカ）を充填したカラムを接続した高速液体クロマトグラフに PTH-メチオニン ( $5 \mu l$ )、PTH-ロイシン ( $10 \mu l$ )、PTH-トリプトファン ( $20 \mu l$ )、PTH-リシン ( $100 \mu l$ ) をそれぞれ5回注入し、カラム温度50°Cの条件下で、それぞれの保持時間を測

定し、相対標準偏差 (coefficient of variation: C V) を計算し再現性を検討した。クロマトグラフィーの条件として、流速 1.0 ml/min、溶出液は水を用いて、254 nm の紫外外部吸収により各種 PTH - アミノ酸を検出した。

5 ② C. V. 値の算出法

各サンプルを一定の条件下 (温度、注入量) で 5 回測定し、その値を用いて算術平均値及び標準偏差値を求めそこから C. V. 値を算出した。

$$CV = \frac{s}{x} \times 100 (\%)$$

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

x : 算術平均値

x i : 測定値

s : 標準偏差

CV(coefficient of variation) 値 (相対標準偏差)

(6) 温度制御することで保持時間を自由にコントロールすることが可能であり

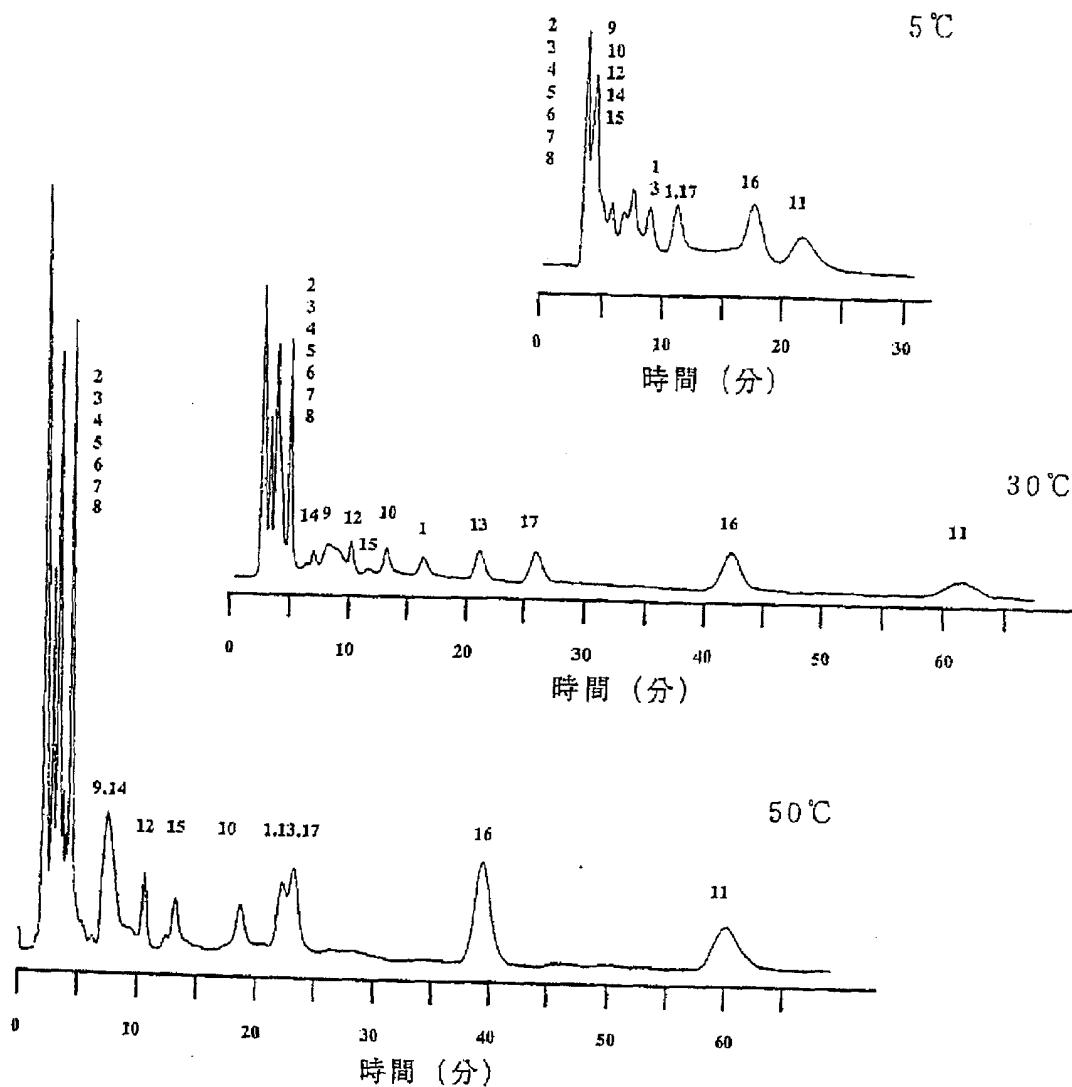
、分離精度を制御できる

10 (7) 担体を再生する必要がなく、温度制御により何度も繰り返し使用可能である。

## 請求の範囲

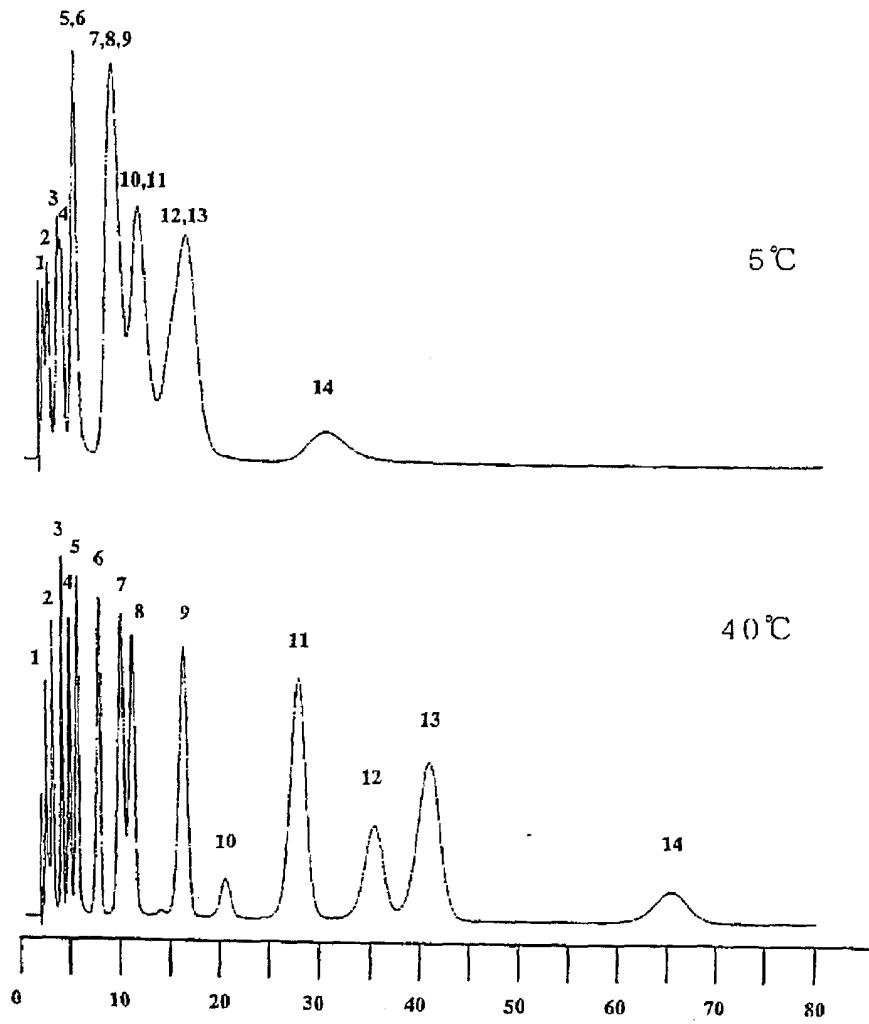
1. 移動相を水系に固定したままで、固定相表面の親水性／疎水性のバランスを外的信号によって変化させることができある充填剤を用いて PTH-アミノ酸のクロマトグラフィーによる分離を行うことを特徴とする PTH-アミノ酸の分離方法。
2. 外的信号が温度変化である請求項1記載の PTH-アミノ酸の分離方法。
3. 充填剤が、担体表面に温度応答性高分子で化学修飾したクロマトグラフィー用充填剤である請求項1記載の PTH-アミノ酸の分離方法。
4. 充填剤が、ラジカル重合法を用いて温度応答性高分子を担体表面に化学修飾したクロマトグラフィー用充填剤である請求項3記載の PTH-アミノ酸の分離方法。
5. 温度応答性高分子が、末端にアミノ基、カルボキシル基、或いは水酸基等を有するポリアルキルアクリルアミド或いはその共重合体である請求項3または4記載の PTH-アミノ酸の分離方法。
6. ポリアルキルアクリルアミドが、ポリ (N-イソプロピルアクリルアミド)、ポリジエチルアクリルアミドまたはポリアクリロイルピロリジンのいずれか一種である請求項5記載の PTH-アミノ酸の分離方法。
7. アミノ基、カルボキシル基、或いは水酸基等を有するポリアルキルアクリルアミド或いはその共重合体で化学修飾したクロマトグラフィー用充填剤よりなる固定相に PTH-アミノ酸を保持させた後、外部温度を段階的に変化させる温度グラディエント法により固定相表面の親水性／疎水性のバランスを変化させ、同一の移動相を通過させることによって PTH-アミノ酸を分離することを特徴とする PTH-アミノ酸の分離方法。
8. 移動相が水系溶媒である請求項7記載の PTH-アミノ酸の分離方法。

図 1



1/5

図 2

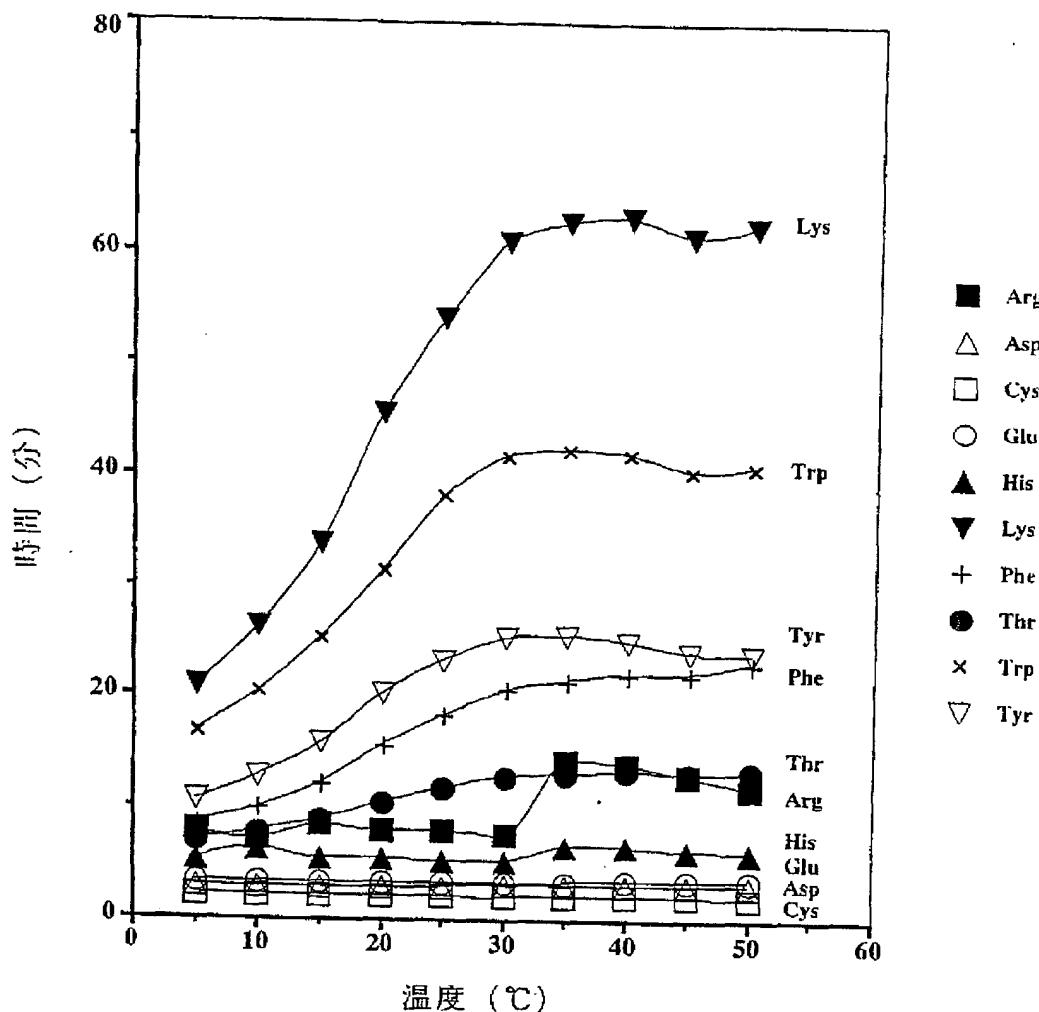


2/5

差替え用紙 (規則26)

図 3

PTH-アミノ酸の温度と保持時間の関係 1

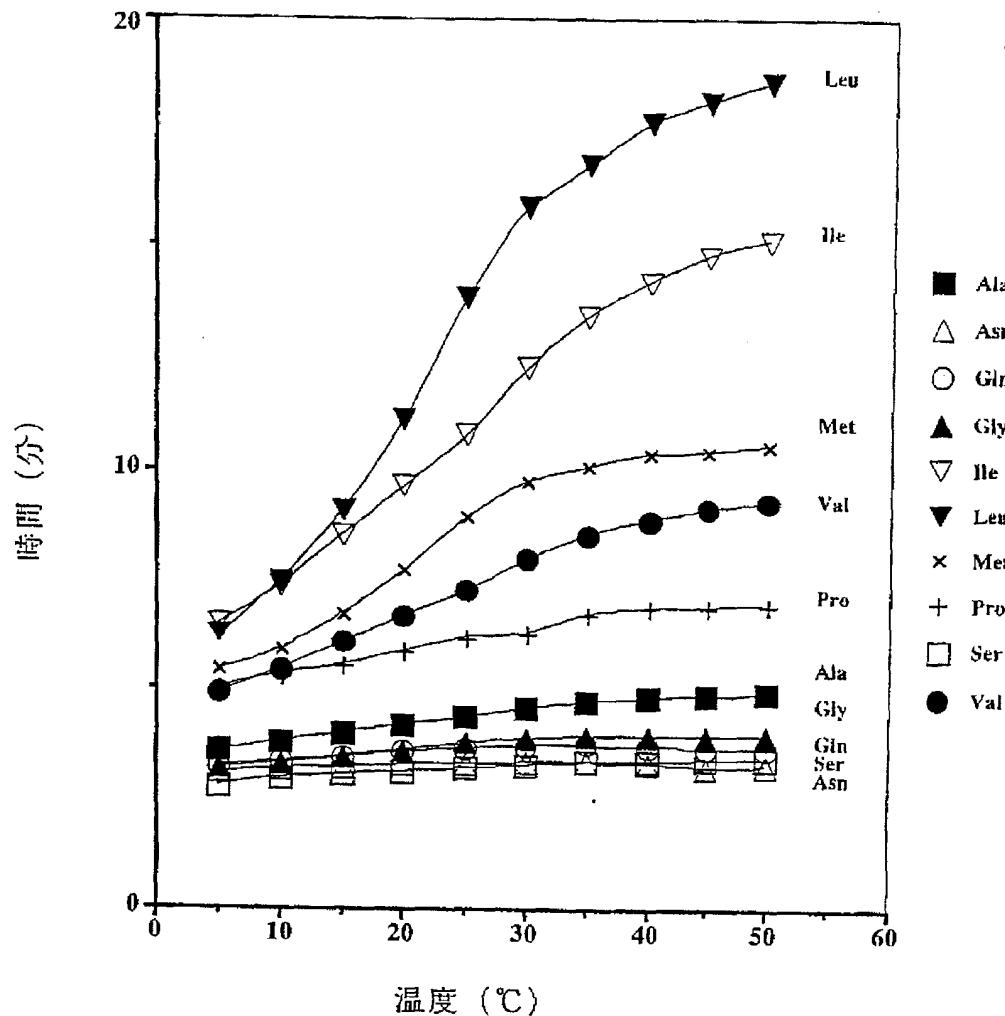


3 / 5

差替え用紙（規則26）

図 4

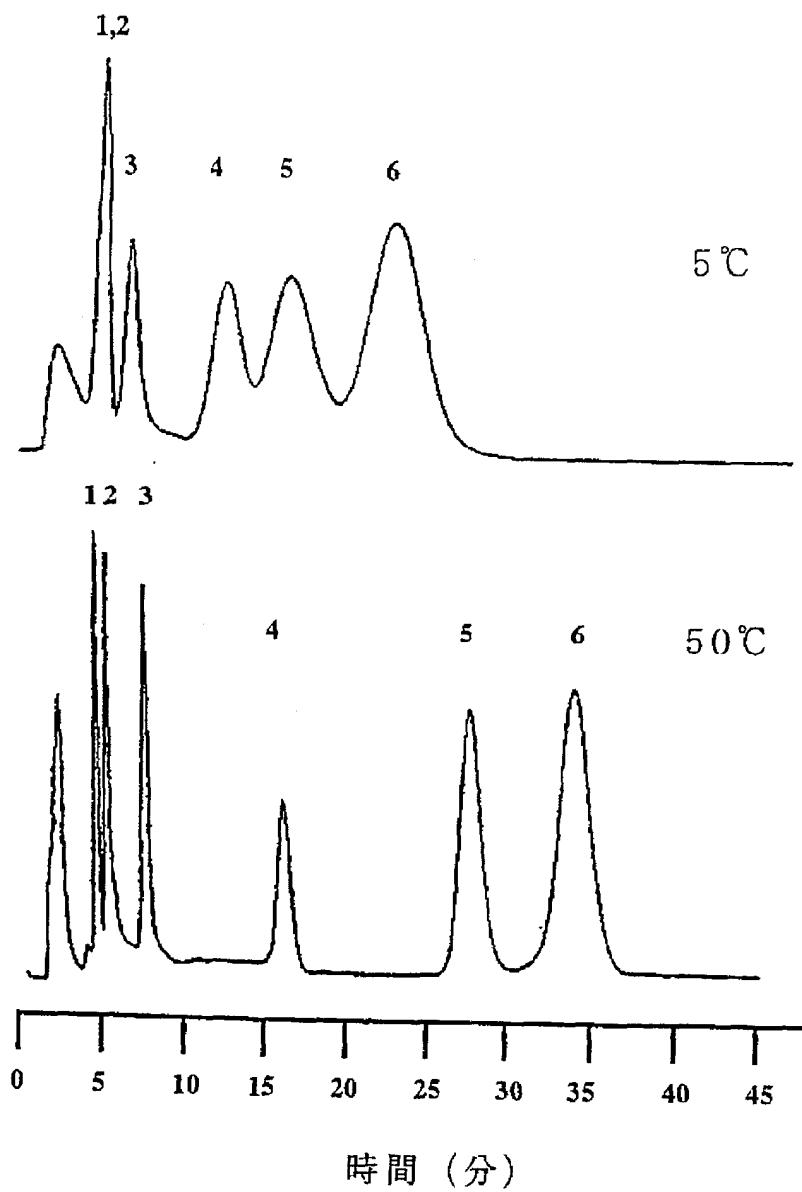
PTH-アミノ酸の温度と時間の関係 2



4/5

差替え用紙（規則26）

図 5



5/5

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP98/00296

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl<sup>6</sup> G01N30/88, G01N30/48

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl<sup>6</sup> G01N30/88, G01N30/48, G01N30/26

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1926 - 1998
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971 - 1998
Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994 - 1998

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAS ONLINE ("ISOPROPYLACRYLAMIDE" + "DIMETHYLACRYLAMIDE") X  
"CROMATOG?"

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP, 6-18503, A (Toray Industries, Inc.), January 25, 1994 (25. 01. 94) (Family: none)	1 - 8
A	JP, 6-331620, A (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), December 2, 1994 (02. 12. 94) (Family: none)	1 - 8
A	Akira Hosoya et al., "Control of Selectivity for Separation in HPLC using New Temperature-Responsive High-Molecular-Weight Filler (in Japanese)", Chromatography, 14(5), p. 122-123 (1993)	1 - 8
A	Hideko K. et al., Temperature-Responsive Liquid Chromatography. 2. Effects of Hydrophobic Groups in N-Isopropylacrylamid Copolymer-Modified Silica, Anal. Chem., 68(1), p. 100-105 (1996)	1 - 8

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

## \* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reasons (as specified)
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search February 6, 1998 (06. 02. 98)	Date of mailing of the international search report February 24, 1998 (24. 02. 98)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

TOKIO (WO 9633064A1)

## 国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP98/00296

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int' C1 G01N30/88  
G01N30/48

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int' C1 G01N30/88  
G01N30/48  
G01N30/26

## 最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報 1926-1998年

日本国公開実用新案公報 1971-1998年

日本国登録実用新案公報 1994-1998年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)  
CAS ONLINE (「ISOPROPYLACRYLAMIDE」+「DIMETHYLACRYLAMIDE」) × 「CROMATOG?」

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP, 6-18503, A, (東レ株式会社) 25. 1月. 1994(25.01.94) (ファ ミリーなし)	1-8
A	JP, 6-331620, A, (和光純薬工業株式会社) 2. 12月. 1994(02.12.9 4) (ファミリーなし)	1-8
A	細矢 慎ら, 「新しい温度応答性高分子充填剤を用いるHPLCに おける分離選択性制御」, Chromatography, 14(5), p. 122-123(1993)	1-8
A	Hideko K, et al., Temperture-Responsive Liquid Chromatography. 2. Effects of Hydrophobic Groups in N-Isopropylacrylamid Copo lymer-Modified Silica, Anal. Chem., 68(1), p. 100-105(1996)	1-8

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
 「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの  
 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献  
 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 06. 02. 98	国際調査報告の発送日 24.02.98
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 亀田 宏之 印 2 J 9407

電話番号 03-3581-1101 内線 3252

様式PCT/ISA/210 (第2ページ) (1992年7月)